

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-209595

(43)Date of publication of application : 31.08.1988

(51)Int.Cl.

C12P 19/12  
C12N 9/42  
//(C12P 19/12  
C12R 1:80 )  
(C12N 9/42  
C12R 1:80 )

(21)Application number : 62-042844

(71)Applicant : TOWA KASEI KOGYO KK

(22)Date of filing : 27.02.1987

(72)Inventor : MURAKAMI KAZUO  
KUSAKABE ISAO  
BOKU KIKON  
HARIO YUKARI  
SHIMADA NORIO  
TAKEMURA MOTOHIRO

## (54) PRODUCTION OF BETA-1,4-MANNOBIOSE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To produce mannobiose having high utility value selectively and in high yield almost without forming mannotriose, by treating mannan with a  $\beta$ -mannase-containing composition produced by a specific cell.

CONSTITUTION: Fungi belonging to the genus *Penicillium* are found from soil in the Philippines as a result of searching a microorganism to yield a  $\beta$ -mannase-containing composition having activity suitable for producing  $\beta$ -1,4-mannobiose useful as a synthetic raw material for saccharide chain or a drug from the natural world. One of the fungi is named as *Penicillium purpurogenum* NO. 618 and deposited as FERM P-9189. The fungus produces a  $\beta$ -mannase-containing composition having high decomposing activity on mannan and treatment of mannan with the fungus selectively forms mannobiose almost without producing mannotriose.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-209595

⑪ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)8月31日

C 12 P 19/12  
C 12 N 9/42  
//C 12 P 19/12  
C 12 R 1:80  
(C 12 N 9/42  
C 12 R 1:80)

7236-4B  
7823-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑭ 発明の名称  $\beta$ -1, 4-マンノビオースの製造法

⑮ 特 願 昭62-42844

⑯ 出 願 昭62(1987)2月27日

⑰ 発 明 者 村 上 和 雄 茨城県新治郡桜村並木2丁目116-103  
⑱ 発 明 者 日 下 功 千葉県松戸市緑ヶ丘1丁目87 松戸住宅1-303  
⑲ 発 明 者 朴 貴 根 茨城県新治郡桜村天久保4丁目7の1 栗原ハイツB-201  
⑳ 発 明 者 針 生 ゆ かり 東京都北区栄町34-12  
㉑ 発 明 者 島 田 規 男 東京都足立区大谷田1-1-2-1004  
㉒ 発 明 者 竹 村 元 宏 埼玉県北本市下石戸下615-8  
㉓ 出 願 人 東和化成工業株式会社 東京都千代田区大手町2丁目1番2号  
㉔ 代 理 人 弁理士 太田 恵一

明 細 書

1. 発明の名称

$\beta$ -1, 4-マンノビオースの製造法

2. 特許請求の範囲

1 次の理化学的性質、

① 作用

$\beta$ -マンナンナーゼ活性及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有し、マンナンに作用して、主として $\beta$ -1, 4-マンノビオースを生成し、マンノトリオースをほとんど生成しない。

② 基質特異性

マンナン、ガラクトマンナンに特異的に作用するが、キシラン、セルロースには作用しない。

③ 至適pH及び安定pH範囲

至適pHは約5.8、安定pH範囲は約4~約8である。

④ 至適温度

約40~約60℃

⑤ pHによる失活の条件(30℃)

pH5.8で3時間保持した時の活性を100%とすると、pH2で約65%、pH4で約90%及びpH8で約95%の活性がある。

⑥ 温度による失活の条件(pH5.8)

温度50℃で3時間保持した時の活性を100%とすると、40℃で約100%、70℃で約40%の活性がある。

を有する、 $\beta$ -マンナンナーゼ含有組成物を、マンナン又はマンナン含有天然物に作用させることを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノビオースの製造法。

2  $\beta$ -マンナンナーゼ含有組成物がペニシリウム属に属する $\beta$ -マンナンナーゼ生産菌を培養して得られる培養液又は培養ろ液である特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -1, 4-マンノビオースの製造法。

3 ペニシリウム属に属する $\beta$ -マンナンナーゼ生産菌がペニシリウム・パープルゲナム№618(微工研菌第9189号)である特許請求の範囲

第2項記載の $\beta$ -1,4-マンノビオースの製造法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明は $\beta$ -1,4-マンノビオースの製造法、更に詳細には、糖鎖の合成原料あるいは医薬として有用な $\beta$ -1,4-マンノビオース（以下、単にマンノビオースということがある）の製造法に関する。

#### (従来の技術及びその問題点)

マンノビオースは、D-マンノースが $\beta$ -1,4-グリコシド結合で2個結合した2糖類で、例えばマンナンを酵素又は酸で部分的に加水分解し、加水分解液から精製・単離することにより得られる。

従来、この $\beta$ -1,4-グリコシド結合を切断する酵素としては、例えばアスペルギルス属、バチルス属、トリコデルマ属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等に属する微生物が産生する $\beta$ -

つまりストレプトミセス・エスピー№17の産生する $\beta$ -マンナナーゼは、①活性が低くマンノビオースの生産効率が悪い、②マンノビオースと共晶を形成するマンノトリオースの生産量が多いため、マンノビオースの単離が困難である、及び③マンノトリオース同様分離が困難なガラクトマンノオリゴ糖を生成する等の欠点を有していた。

また、酸による部分加水分解による方法は、マンノビオースのみ製造する目的には不適当である点で、従来の $\beta$ -マンナナーゼによる方法と同様の欠点を有していた。

#### (問題点を解決するための手段)

本発明者は、かかる実情において、マンノビオースの製造に更に適した活性を有する $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物を産生する微生物を自然界から検索した結果、フィリビンの土壌から分離したペニシリウム (*Penicillium*) 属に属する微生物が、①マンナンに対し高い分解活性を有する $\beta$ -マン

マンナナーゼが知られている。

しかしながら、従来知られている $\beta$ -マンナナーゼは活性が低く、これをマンナン等に作用させた場合、いずれも加水分解あるいは部分加水分解の結果、マンノビオース以外にD-マンノース、マンノトリオース、その他のオリゴ糖が生成し、更に糖化率も悪く特にマンノビオースのみ生産する目的には有利なものとは云えなかった。

最近、放線菌であるストレプトミセス・エスピー (*Streptomyces* sp.) №17が産生する $\beta$ -マンナナーゼは、従来の $\beta$ -マンナナーゼに比べマンノビオースを多量に生成することが報告された (*Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 29 (3), 167-172 (1985)) が、この $\beta$ -マンナナーゼによりコブラマンナンを加水分解して、D-マンノース12重量% (以下、単に%で示す)、マンノビオース71%、マンノトリオース9%、オリゴ糖8%の糖組成物を得ているにすぎない。

ナナーゼ含有組成物を産生すること、④これをマンナン又はマンナン含有天然物に作用させた場合、驚くべきことにマンノトリオースをほとんど生成せずマンノビオースを選択的に生成すること、かつ、⑤この $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有するため、コブラマンナンのようなガラクトマンナンをマンノビオースにまで加水分解することができ、ガラクトマンノオリゴ糖を生成しないことを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、次の理化学的性質、

#### ①作用

$\beta$ -マンナナーゼ活性及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有し、マンナンに作用して、主として $\beta$ -1,4-マンノビオースを生成し、マンノトリオースをほとんど生成しない。

#### ②基質特異性

マンナン、ガラクトマンナンに特異的に作用

するが、キシラン、セルロースには作用しない。

#### ④至適pH及び安定pH範囲

至適pHは約5.8、安定pH範囲は約4～約8である。

#### ⑤至適温度

約40～約60℃

#### ⑥pHによる失活の条件(30℃)

pH5.8で3時間保持した時の活性を100%とすると、pH2で約65%、pH4で約90%及びpH8で約95%の活性がある。

#### ⑦温度による失活の条件(pH5.8)

温度50℃で3時間保持した時の活性を100%とすると、40℃で約100%、70℃で約40%の活性がある。

を有する、 $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物を、マンナン又はマンナン含有天然物に作用させることを特徴とする $\beta$ -1,4-マンノビオースの製造法を提供するものである。

#### (II)培地における生育状態

##### ①麦芽寒天培地

麦芽寒天培地での生育は5℃では全く起こらず、25℃では7日間でコロニーの直径が3～4cmに達する。性状はビロード状である。14日間でコロニーの直径は7～8cmに達し、中心部より順次分生子形成し、それに従ってくすんだ黄緑色、かんらん緑色、灰緑色等を生ずる。集落裏面に一部赤色部があり、りんご様の芳香がする。37℃での生育では7日間ではコロニーの直径が5～6cmに達する。14日間ではコロニーの直径が8～9cmに達し、良く分生子形成し、色は黄緑から灰緑色になる。コロニーの裏面は中心部が赤色である。

##### ②ツァベック寒天培地

ツァベック寒天培地での生育は5℃では全く起こらない。25℃では7日間でコロニーは直径1～2cmに達し、性状はビロード状である。14日間ではコロニーの直径が3～4cmに達するが分生

本発明で使用される $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物としては、例えばペニシリウム属に属する $\beta$ -マンナナーゼ生産菌を培養して得られる培養液、特に好ましくは培養ろ液等が挙げられる。ペニシリウム属に属する $\beta$ -マンナナーゼ生産菌としては、例えばペニシリウム・パープルゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、ペニシリウム・クリソゲナム (*P. chrysogenum*)、ペニシリウム・エクspansum (*P. expansum*)、ペニシリウム・フニコロサム (*P. funiculosus*)、ペニシリウム・イサリフォーム (*P. isariforme*)、ペニシリウム・オクロクロロン (*P. ochro-chloron*)、ペニシリウム・ビスカリウム (*P. piscarium*)、ペニシリウム・バルクロサム (*P. verruculosum*)、ペニシリウム・フォートマンニ (*P. wortmanni*)等が挙げられる。例えば、ペニシリウム・パープルゲナム №618は本発明者が見出した新菌株であって、次の菌学的性質を有する。

子は形成しない。37℃での生育では7日間でコロニーの直径が1～2cmである。14日間でコロニーは4～5cmに達し中心部が灰緑色となる。

##### ③ワックスマン氏寒天培地

ワックスマン氏寒天培地での生育は5℃では起こらない。25℃では7日間でコロニーの直径が4～5cmに達し、コロニーの性状は白いビロード状である。14日間ではコロニーの直径は7～8cmに達し、分生子部分の色は灰緑色で、コロニーの裏面は赤色である。37℃での生育では7日間でコロニーの直径が4～5cmに達し、性状はビロード状である。14日間でコロニーの直径は7～8cmに達し、コロニーの分生子部分は灰緑色となる。

##### ④ポテト・デキストロース寒天培地

ポテト・デキストロース寒天培地での生育は5℃では起こらない。25℃では7日間でコロニーの直径は5～6cmに達し、性状は白いうすいビロード状である。14日間ではコロニーの直径は8

～9 cmに達する。37℃での生育では7日間でコロニーの直径が5～6 cmに達し、性状は白いビロード状である。14日間でコロニーの直径は8～9 cmに達する。分生子の形成は少ない。

## (2) 生理的、生態的性質

### ① 最適生育条件

pH 5～7

温度 32～37℃

### ② 生育の範囲

pH 4～8

温度 15～45℃

### ③ その他、顕著な特徴

マンナン含有培地での培養によりβ-マンナーゼを菌体外に生産する。

## (3) 顕微鏡的所見

### ① 分生子柄

滑面で直径は100～150×2.5～3 μである。

### ② ペニシリ

対称の複輪生体である。

### ③ メトレ

4～6本の束生を持ち、直径は10～15×3 μである。

### ④ フィアライド

4～6本の輪生を持ち直径は10～12×2～2.5 μである。

### ⑤ 分生子

形状は亜球形で直径は2.5～3×2.5～3 μである。

以上の菌学的性質を「ア・マニュアル・オブ・ザ・ペニシリヤ (A MANUAL OF THE PENICILLIA)」(1949) (ケネス・ビー・レーパー及びチャールズ・トム (KENNETH B. RAPER and CHARLES THOM))、  
「ザ・ジーナス・ペニシリウム・アンド・イツ・テレオモルフィック・ステーツ・ユー・ペニシリウム・アンド・タラロミセス (The genus

PENICILLIUM and its teleomorphic states eusepicillium and talaromyces)」(1979) (ジョン・アイ・ピット (JOHN I. PITT)) 及び「菌類図鑑 (下)」(1978) (樽啓介他) に照合し、その菌種を検索したところ、本菌株は、ペニシリウム・パーブルゲナムに属する。

更に、本菌株は、近似するペニシリウム・パーブルゲナム・ストール (Penicillium purpurogenum stall) と比較すると、ペニシリウム・パーブルゲナム・ストールは、37℃での培養では25℃での培養に比べ生育が悪く、また、麦芽寒天培地で集落裏面は黒色でツァベック培地で裏面が赤くなると上記文献に記載されているが、本菌株では、逆に37℃で生育状態が良く、また麦芽寒天培地で集落裏面に赤い色素を生産する点で相異する。

従って、本発明者は、本菌株をペニシリウム・パーブルゲナム株 618 と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第9189号

(FERM P-9189) として寄託した。

β-マンナーゼ含有組成物を得るためには、ペニシリウム属に属するβ-マンナーゼ生産菌、例えばペニシリウム・パーブルゲナム株 618 を栄養源含有培地に接種して好氣的に培養する。

培養に使用される栄養源としては、例えばコブラミル、ヤシ殻等由来のマンナン等が好ましい。コブラミルとは、ココナツヤシより油脂を搾出した残渣で通常マンナンを約45～50%含有している。栄養源としては、例えば尿素、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、酵母エキス、ペプトン、コーンステアブリカー等を使用することができる。培地としては、更にリン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩類を含むものが好適に使用される。

培養は、好ましくは培養温度30～40℃、特に好ましくは32～37℃、初発pH5～6で振盪培養等により行なうことができる。かかる条件で

培養を行なえば、培養ろ液の $\beta$ -マンナナーゼ活性は、通常培養5日前後で最高に達する。

かくして得られる $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物を、マンナン又はマンナン含有天然物に作用させれば、マンノビオースを主成分とする加水分解液が得られる。

マンナンとしては、例えばココナツヤシ殻、ぞうげヤシ殻、針葉樹等に由来するものが挙げられる。また、マンナン含有天然物としては、例えばココナツヤシ殻、ぞうげヤシ殻等のマンナンを含有するものであれば何れをも使用できるが、大量に生産され容易に入手できるものとしてコブラミルが特に好適である。

$\beta$ -マンナナーゼ含有組成物をマンナン又はマンナン含有組成物に作用させるには、例えば $\beta$ -マンナナーゼ含有培養液をろ過した後、ろ液に対して好ましくは1~20% (W/V)、特に好ましくは7~10% (W/V)のコブラミルをこのろ液に加

は、このままではこの加水分解液からマンノビオースを結晶化することは困難である。また、マンノトリオースは水に対する溶解性が低いため、マンノビオースの結晶化の際に共晶を生じ、マンノトリオースの含量が多い場合には分離が困難となる。従って、加水分解液からマンノビオースを単離するにはこれらのことを考慮して行なう必要がある。尤も、仮上の如くして得られた加水分解液には、マンノトリオースがほとんど含まれないため、主としてD-マンノースの除去を行なえばよく、D-マンノースを除去した加水分解液を濃縮、結晶化処理すれば、通常純度が98%以上のマンノビオースが単離できる。

加水分解液からD-マンノースを除去する方法としては、例えばD-マンノースを酵母で発化する方法、あるいはクロマト分離法等が挙げられる。

D-マンノースを酵母で発化する方法は常法に従って実施することができる。この場合、酵母は

え、好ましくはpH4.5~8.0、特に好ましくはpH5.5~6.5、40~50℃で約2日間攪拌する。

かかる条件では、約2日間で加水分解が終了する。

かくして得られる加水分解液は、液体クロマトグラフィ分析によれば、原料の収穫期の差、圃の経時変化、培養条件等によって異なるが、ほぼ次の糖組成を有し、マンノトリオース及びガラクトマンノオリゴ糖をほとんど含まない。

D-マンノース	1~20%
マンノビオース	65~90%
マンノトリオース	1~3%
その他の単糖	5~15%

なお、その他の単糖としては、例えばL-アラビノース、D-ガラクトース、D-グルコース等が含まれる。

次いで、加水分解液からマンノビオースを単離する。

加水分解液がD-マンノースを多く含む場合に

D-マンノースを発化するがマンノトリオースは発化しない。

また、クロマト分離法は、加水分解液を例えば金属塩型イオン交換樹脂、ゼオライト等の無機物担体を充填したカラムに通し、マンノビオース画分を採取することにより行なわれる。

#### (作用)

本発明に係る $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物が、これをマンナン等に作用させた場合、後記実施例に示す如く、マンノビオースを極めて選択的に生成する作用順序は次のようであると考えられる。すなわち、本発明に係る $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物の $\beta$ -マンナナーゼはエンド型 $\beta$ -マンナナーゼと考えられる。そして、このエンド型 $\beta$ -マンナナーゼはマンナンをランダムに切断する。しかし、一旦生成したマンノビオースには全く作用せず、マンノトリオースへの作用性がやや弱い。一方、マンノース単位に切断されたものは再結合

によって2糖以上の糖に合成される。このため、通常は、最終的にはマンノビオースとマンノトリオースの混合物が生成する。

しかしながら、本発明に係る $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物の活性は極めて高いため、マンノトリオースの生成量が少なくなっている。この $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物の活性は、例えばこれにマンナン等のみ加えることにより作用させる場合、8 u/培養液 $\mu$ 以上であることが好ましく、活性の低下に従いマンノトリオースの生成量は増加する。

このことは、例えば後記実施例1において、培養液を希釈し、酵素活性を低下させた以外は実施例1と同様にマンナンに作用させたところ、48時間加水分解後の液中の糖含有量が減少したのみならず、マンノトリオース含有率が増加したことによって裏づけられる。

(実施例)

表面に広げる。生えてきたコロニー中周囲に透明帯(マンナン溶解部分)のあるものを分離、採取し、約500検体をスラント化した。この各スラントを100 $\mu$ l坂口フラスコで振盪培養を行ない $\beta$ -マンナナーゼ活性を測定し、活性のあるものを50検体選択した。更に100 $\mu$ l坂口フラスコで振盪培養を行ない $\beta$ -マンナナーゼ活性を測定し、最も活性のある本菌を得た。

#### 参考例2

コブラミル4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、ペプトン0.9%、酵母エキス0.2%、コーンステープリカー0.5%からなる液体培地(pH5.4) 100 $\mu$ lを500 $\mu$ l坂口フラスコに採取し、定法により加熱殺菌した。これにベニシリウム・パーブルゲナム№618の1白金耳を接種し、35 $^{\circ}\text{C}$ で5日間振盪培養した。この培養液をろ過した後マンナンの加水分解活性を測定したところ14.8 u/培養液 $\mu$ であった。

次に実施例、参考例及び比較例により本発明を説明する。

なお、本発明に係る $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物の活性は次に示す方法で測定した。

pH5.8のマックルベインバッファー水溶液4 $\mu$ l、蒸留水5 $\mu$ lと粉砕した脱脂コブラミル150 $\mu$ gを15分間50 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、被検液1 $\mu$ lを加え50 $^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させた。反応液に生じた還元糖をソモギー法により定量する。被検液1 $\mu$ lが1分間に還元糖1 $\mu$ gを遊離する時の値を1単位(u)と定義する。

#### 参考例1

$\beta$ -マンナナーゼ生産菌、ベニシリウム・パーブルゲナム№618は、次の方法により分離した。フィリピンの土壌0.5gを滅菌水10 $\mu$ lで懸濁し、その0.5 $\mu$ lを滅菌水10 $\mu$ lに懸濁し、更にその0.5 $\mu$ lを滅菌水10 $\mu$ lに懸濁し、その一滴をシャーレ中のマンナン寒天培地に滴下し、

#### 実施例1

5 $\mu$ lのジャファーマンターにコブラミル4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、ペプトン0.9%、酵母エキス0.2%、コーンステープリカー0.5%からなる液体培地(pH5.4) 3 $\mu$ lを入れ、定法により加熱殺菌した。これに参考例2と同じ方法で調製した培養液300 $\mu$ lを種菌として接種した後、35 $^{\circ}\text{C}$ で4日間培養した。この培養液の酵素活性を測定したところ16.2 u/培養液 $\mu$ であった。

この培養液をろ過したところ2.8 $\mu$ lのろ過液が得られた。このろ過液にコブラミル280gを加えpH5.8、50 $^{\circ}\text{C}$ で48時間加水分解した後ろ過したところ2.5 $\mu$ lのろ過液を得た。このろ過液を液体クロマトグラフィーで分析したところ下記の糖組成であった。

D-マンノース	1.2%
マンノビオース	84.2%



マンノトリオース 1.9%

その他の単糖 12.7%

## 実施例2

実施例1で得られた加水分解ろ過液1ℓにパン酵母2gを加え35℃で2日間培養した。この質化液をろ過した後糖組成を分析したところ次の通りであった。

D-マンノース 0.1%

マンノビオース 91.5%

マンノトリオース 2.1%

その他の単糖 6.3%

このろ過液を75%迄濃縮したところ59gの濃縮液が得られた。この濃縮液に30mlのエタノールを加え1日間結晶化させたところ23.5gのマンノビオースが得られた。このものの純度は98.1%、融点191~192℃であった。

## 実施例3

実施例1で得られた加水分解ろ過液1ℓを定法

マンノビオース 90.5%

マンノトリオース 2.5%

その他の単糖 6.4%

この液を75%迄濃縮したところ12.3gの濃縮液が得られた。この濃縮液にエタノール6mlを加え1日間結晶化したところ7.6gのマンノビオースが得られた。純度は98.2%、融点191~192℃であった。

(以下余白)

によりイオン交換樹脂で脱塩した後50%迄濃縮したところ88gの濃縮液が得られた。

次にポリスチレンスルホン酸型陽イオン交換樹脂SK・IBS(三菱化成工業製、50~100メッシュ)300mlをジャケット付きカラム(内径2.4cm×長さ80cm)に充填し、これに5%塩酸水溶液を流し水洗した後、次いで5%水酸化ナトリウム水溶液を流し水洗して樹脂をナトリウム型とした。このカラムを60℃に保温しながら上記で調製した濃縮液30gを塔上部より供給し、次いで水で連続的に溶出してフラクションコレクターにより分画した。この際の溶出液の流速は100ml/時で、各分画容量は10mlであった。各フラクションを液体クロマトグラフィで分析した。その結果を第1表及び第1図に示す。

このフラクション№14~22を集めた液の糖組成は次の通りであった。

D-マンノース 0.6%

第 1 表 単位mg/ml

フラクション№	D-マンノース	マンノビオース	マンノトリオース	その他の単糖	合計
13	0	0	0	0	0
14	0	3	1	2	6
15	0	19	2	4	25
16	0	39	3	6	48
17	0	69	3	7	79
18	1	95	3	7	106
19	1	127	3	7	138
20	1	151	3	7	162
21	2	169	3	8	182
22	2	170	2	11	185
23	2	147	2	20	171
24	3	119	2	28	152
25	3	67	1	32	103
26	3	28	0	27	58
27	3	12	0	16	31
28	2	7	0	7	16
29	1	0	0	3	4
30	0	0	0	0	0

## 比較例 1

参考例 2 において、 $\beta$ -マンナナーゼ生産菌として、ペニシリウム・バーブルゲナム № 618 の代りにストレプトミセス・エスピー № 17 を用いた以外は参考例 2 と同様に操作して培養液を得た。次いでこの培養液を種菌として用いて実施例 1 と同様にして培養液を得た。この培養液の  $\beta$ -マンナナーゼ活性は 5.3 u/培養液 1 ml であった。

従って、本発明に使用される  $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物は、ストレプトミセス・エスピー № 17 の培養液に比べ 3 倍以上の  $\beta$ -マンナナーゼ活性を有することが明らかとなった。

更にこの培養液をろ過し 2.7 ml のろ液を得た。このろ液にコブラミル 140 g を加え、pH 6.8、40℃ で 48 時間加水分解した後ろ過したところ、2.5 ml のろ液を得た。このろ液の糖組成は下記のようであった。

D-マンノース 10.5%

マンノビオース	63.5%
マンノトリオース	9.8%
オリゴ糖	11.2%
その他の単糖	5.0%

従って、本発明の方法では、マンノトリオース及びオリゴ糖（主にガラクトマンノオリゴ糖）をほとんど含まない糖液を製造できることが明らかとなった。

## (発明の効果)

本発明のマンノビオースの製造法は、叙上の如く、ペニシリウム属に属する  $\beta$ -マンナナーゼ生産菌の産生する  $\beta$ -マンナナーゼ含有組成物をマンナン等に作用せしめるものであるため、マンノトリオース及びガラクトマンノオリゴ糖をほとんど含まないマンノビオース含有糖組成物を得ることができ、これからマンノビオースを分離するための精製工程が簡略化し容易なものとなった結果、従来困難であったマンノビオースの大量生産を可

能にした。

マンノビオースは、従来試薬として販売されておらず、従って用途開発研究が行なわれてなかった。近年、動物細胞壁に存在する糖鎖の研究が進み、糖鎖が抗原抗体に関与していることが判明した。この糖鎖中にはマンノビオース骨格が存在しており、マンノビオースが安価に製造出来るならばこの糖鎖の合成原料として使用できる。更に転移酵素を使用することによりマンノースを含む新規な糖を製造することができ、医薬品として有用である。

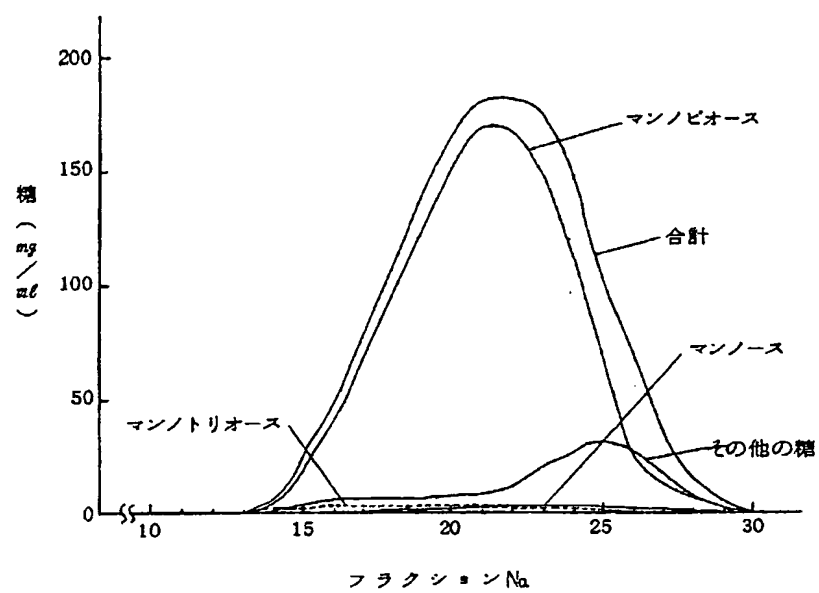
## 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は実施例 3 における糖を含む糖液の溶出曲線を示す図面である。

特許出願人 東和化成工業株式会社

代理人 太田 恵一

第 1 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**